

第2708168号

(45)発行日 平成10年(1998)2月4日

(24)登録日 平成9年(1997)10月17日

| (51)Int.Cl.*   | 識別記号 | 庁内整理番号  | F I           | 技術表示箇所 |
|----------------|------|---------|---------------|--------|
| C 1 2 N 1/21   |      |         | C 1 2 N 1/21  |        |
| C 1 2 P 21/02  |      |         | C 1 2 P 21/02 | C      |
| C 1 2 N 15/09  |      | 9282-4B | C 1 2 N 15/00 | A      |
| (C 1 2 N 1/21  |      |         |               |        |
| C 1 2 R 1:125) |      |         |               |        |

請求項の数 8 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願昭63-38482  
 (22)出願日 昭和63年(1988)2月23日  
 (65)公開番号 特開平1-215280 ✓  
 (43)公開日 平成1年(1989)8月29日

(73)特許権者 999999999  
 昭和電工株式会社  
 東京都港区芝大門1丁目13番9号  
 (72)発明者 鈴木 和樹  
 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電  
 工株式会社生化学研究所内  
 (72)発明者 高橋 薫  
 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電  
 工株式会社生化学研究所内  
 (72)発明者 矢島 晋博  
 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電  
 工株式会社生化学研究所内  
 (72)発明者 久留 由美子  
 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電  
 工株式会社生化学研究所内  
 (74)代理人 井野士 青木 朗 (外4名)

審査官 植野 浩志

(54)【発明の名称】 微生物の改良

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御配列が、該目的遺伝子の発現を制御することができる位置及び方向で導入されている改良された微生物であって、前記発現制御配列が、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補的な配列による相間的交差により導入されたものであることを特徴とする微生物。

【請求項2】 前記微生物がバチルス(Bacillus)属微生物である請求項1に記載の微生物。

【請求項3】 前記微生物がバチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)又はバチルス・アミロリクエファシエンス(Bacillus amyloliquefaciens)である請求項2に記載の微生物。

【請求項4】 前記発現制御配列がプロモーターであり、該プロモーターが前記遺伝子の上位に挿入されている、請求項1-3のいずれか1項に記載の微生物。

【請求項5】 該プロモーターがバチルス属微生物のプロモーター又は、バチルス属微生物のファージのプロモーターであり、該プロモーターが前記遺伝子の上位に挿入されている、請求項4に記載の微生物。

【請求項6】 前記遺伝子がトリプトファンの合成に係る遺伝子である請求項1-5のいずれか1項に記載の微生物。

【請求項7】 目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御領域を、該目的遺伝子の発現を増進することができる位置及び方向で導入することを特徴とする改良された微生物の製造方法において、前

記発現制御配列を、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補的な配列による相対的交叉により導入することを特徴とする方法。

【請求項8】 特許請求の範囲第1項に記載の微生物を培養して該遺伝子に係わる生成物を生産せしめ、そして該生成物を採取することを特徴とする有用物質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は有用微生物の新規な改良方法及び該改良方法により製造された微生物、並びに該微生物を用いる有用物質の製造方法に関する。本発明の微生物が改良方法は、既存の遺伝子を含有する染色体に、該遺伝子の発現を制御することができる発現制御配列を外部から導入することを特徴とする。

（従来の技術）

組織変換DNA技術の発展、進歩によってホルモン、ワクチン、インターフェロン等の蛋白質や酵素、アミノ酸、さらにビタミンや抗生物質などの二次代謝産物に至るまで、微生物中で大量生産が可能となった。これは、物質生産に係わる特定の遺伝子を適当な多コピー数のプラスミドベクター上にクローン化し、該プラスミドを適当な微生物中に形質転換法で導入し、物質生産に係わる導入した遺伝子を発現させることにより達成される。この際、活性の高いプロモーター遺伝子を有するプラスミドベクターを用いて、プロモーター遺伝子と目的遺伝子を機能的に連結することにより、遺伝子の発現はより効率的に行われる。しかしながら、プラスミドの脱落が起こったり、プラスミドに変異や欠失が生じる等の為、プラスミドベクターを用いた物質生産は一般的に不安定であり定量的な物質生産には不適当なことがある。

これに代る方法として、宿主微生物の染色体に目的遺伝子をインテグレーションせしめる方法があり、この方法によれば外部から導入された遺伝子を多世代にわたって安定に維持することができるが、該遺伝子の増殖度を上げることが困難であり、このため目的とする生成物の生産性に限界があるという欠点が存在する。

【発明が解決しようとする課題】

従って、目的の物質に係る遺伝子が染色体に安定に維持されており、しかも該遺伝子が強力に発現され、目的物質を効率よく生産することができる微生物及びその創成方法が強く求められている。

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記の問題点を解決すべく種々検討した結果、特定の目的物質の生産に係わる遺伝子をすでに含有する微生物染色体に、該遺伝子の発現を増強することができる強力なプロモーターを導入することにより、目的物質を効率よく生産することができる微生物が得られることを見出し、この発明を完成した。

従って、本発明は、目的物質の生産に係わる遺伝子（目的遺伝子）を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御配列が、該目的遺伝子の発現を制御することができる位置及び方向で導入されている改良された微生物であって、前記発現制御配列が、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補的な配列による相対的交叉により導入されたものであることを特徴とする微生物；目的物質の生産に係わる遺伝子（目的遺伝子）を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御領域を、該目的遺伝子の発現を増強することができる位置及び方向で導入することを特徴とする改良された微生物の製造方法において、前記発現制御配列を、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補的な配列による相対的交叉により導入することを特徴とする方法；並びに、該微生物を培養して該遺伝子に係わる生成物を生産せしめ、そして該生成物を採取することを特徴とする有用物質の製造方法、を提供しようとするものである。

【具体的な説明】

本発明は、目的物質の生産に係る遺伝子をすでにその染色体中に有し該目的物質を生産することができる微生物、及び目的物質の生産に係る遺伝子をすでにその染色体中に有するが該目的物質を事実上生産することができず新たに外部から発現制御遺伝子を導入することにより該目的物質を生産することができる様になる微生物、のいずれにも適用することができる。このような微生物として、例えばバチルス（*Bacillus*）属、エシェリシア（*Escherichia*）属、セラチア（*Serratia*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、ブレヴィバクテリウム（*Brevibacterium*）属、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属等に属する微生物を挙げることができる。バチルス属に属する微生物の例として、例えばバチルス・ズブチリス、バチルス・アミロリクエファシエンス、バチルス・リケニホルミス、バチルス・ステアロサーモフィラス等を挙げることができる。

本発明の方法により製造される目的物質は、遺伝子の直接的な発現生成物である蛋白質又はポリペプチド、例えば各種の酵素類、例えばプロテアーゼ、アミラーゼ、グルコサミイソメラーゼ、セルラーゼ、トリプトファンシメターゼ；各種のペプチド性ホルモン類、例えばインシュリン、成長ホルモン、エンケファリン、ソマトスタチン；各種の抗原類、例えば肝炎ワクチン、ポリオワクチン、ヘルペスワクチン；各種のリンホカイン類、例えばインターフェロン、インターロイキン等であることができる。

本発明の方法により製造される目的物質はまた、遺伝子の直接的な発現生成物である1又は複数の酵素の触媒作用により生産される物質であることができる。この様な

挿入すべき異型解鎖領域は通常、宿主微生物中で増幅することができるプラスミドにより、あるいは宿主微生物中で増幅することができない環状又は線状のDNAとして導入される。目的とするDNAを宿主微生物中に導入するための方法として、DNAを細胞に挿入するために通常用いられる方法のいずれか、例えばカルシウム塩浴法<sup>(2)</sup>、

酵素量 : DNA1  $\mu$ g に対して10ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

DNAポリメラーゼ I

Klenowフラグメント

(pol I) 処理 100mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub> の緩衝液中で消化された 1 μg の DNA (20 μl) に対して、NNAポリメラーゼ I・Klenowフラグメントを 3 ユニット (1 μl)、各 dNTP 2mM (2mM 溶液を 1 μl) 加え、室温で 30 分間インキュベーションする。

細菌ホスファターゼ (BAP)

処理 制限酵素で消化された 1 μg DNA 溶液に対して 0.3 ユニットの BAP を加え、55℃、30 分間インキュベーションする。

T4 DNA ガーゼ

による連結 100mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub> 中で消化された各 DNA 溶液を混合後、100 μM になる様に ATP を加え、さらに T4 DNA リガーゼを 30 ユニット添加し、15℃で 1 夜インキュベーションする。

実施例 1. パチルス・アミロリクエファシエンスからのプロモーターのクローニング及びマーカの付与 (第 1 図)

まず、プロモーター検索ベクター (pGZ1) (Nature, 299, 309 (1981) Goldfarb, D.S. et al.) (このベクターは当業界において広く使用されており、容易に入手することが出来る。) を制限酵素 Hind III で消化し、これと同じく制限酵素 Hind III で消化したパチルス・アミロリクエファシエンス IAM 1521 の染色体 DNA を試験管内で混合し、T4 DNA リガーゼを用いて連結反応を行った後、パチルス・ズブチリス UO<sup>+</sup> 0531 (東京大学応用微生物研究所) にプロトプラスト形質転換法 (S. Chang & S.N. Cohen, Molec. gen. Genet. 168, 111 (1979)) で導入し、250ppm のクロラムフェニコールを含む LB 寒プレートに生じる形質転換体を多数取得した。次にこの形質転換体のクロラムフェニコール耐性度およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼの活性を測定し、活性が一番高い形質転換体パチルス・ズブチリス TFK756 を高活性プロモーターがクローン化されている株として選んだ。TFK756 からプラスミドを分離・精製し、クローン化された 0.3 μM の 3.0 μM の Hind III 断片 DNA をプロモーター活性を有する配列 P756 と命名、P756 をクローン化された pGR 71 を pSDK 756 と命名した。

次に pSDK 756 の P756 プロモーターの上流にマーカとしてのテトラサイクリン耐性遺伝子を組込む為に枯草菌プラスミド pTP5 を制限酵素 Hind III で消化し、これと同じく制限酵素 Hind III で部分消化した pSDK 756 とを混合し、T4 DNA リガーゼを用いて結合反応を行った後、大腸菌 C600 に形質転換を行い、テトラサイクリン耐性で、かつクロラムフェニコール耐性となる形質転換体を得た。これにより pSDK 756 の P756 上流に 1.5 μM のテトラサイクリン耐性遺伝子を組込んだプラスミド pSDK27364 を作

製した。

さらに図 1 に示したようにまず pSDK 27364 を制限酵素 Hind III で部分消化し、Klenow Fragment と 4 種の XTP を用いて、平滑末端を作った。次に、Sna I で消化した BAP で処理した pUC 18 と混合し、T4 DNA リガーゼを用いて結合反応を行い、大腸菌 JM 109 に形質転換を行い、プラスミド pSDK27365 を含む、アンピシリン、テトラサイクリン耐性を示す形質転換体をスクリーニングした。これにより、テトラサイクリン耐性のマーカが付与された P756 を有する DNA 断片の調製ができるプラスミドが取得された。

実施例 2. プロモーター P756 導入用 DNA の調製及び宿主株への導入 (第 2 図)

前記プラスミド pSDK 27365 を EcoR I 及び Xba I で消化、アガロース電気泳動により分離し、フェノール抽出及びエタノール沈澱により精製することにより、テトラサイクリン耐性遺伝子及びプロモーター P756 を含有する 1.5 μM の EcoR I-Xba I 断片を調製した。

一方、パチルス・アミロリクエファシエンスのトリプトファン合成系遺伝子が大腸菌プラスミド pBR321 にクローニングされているプラスミド pSDT1111 を制限酵素 EcoR I 及び Xba I で消化し、アガロース電気泳動により分離し、そしてフェノール抽出及びエタノール沈澱により精製することにより、トリプトファン合成系遺伝子の upstream 部分を含有する 2.5 μM の大きさの EcoR I-Xba I フラグメントを得た。なお、前記プラスミド pSDT1111 を含有する大腸菌は、工業技術院微生物工業技術研究所で微工研寄第 7861 号 (FERMP-7861) として寄託されている。

次に、両フラグメント約 1 μg ずつを混合し、T4 DNA リガーゼを用いて連結反応を行い、これを用いてパチルス・アミロリクエファシエンスのトリプトファン生産株パチルス SD30 のコンピテントセルを次の様に形質転換した。

まず、TBAB 寒天培地 (Difco 社, Bacto Tryptose 10g, Bacto Beef Extract 3g, NaCl 5g, Bacto Agar 15g; H<sub>2</sub>O 1 l) で所縁培養したパチルス SD30 を C1 培地 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, クエン酸ナトリウム 2g, 0.1% IR, MgSO<sub>4</sub> 7.5g 0.1% 糖 5g, カゼンノ酸 0.2g, L-トリプトファン 50ppm, H<sub>2</sub>O 1 l) に OD660 が 0.05 になる様に接種、37℃で振とう培養し、OD660 が 約 0.5 になった時点で遠心分離 (4000rpm, 10 分間) し、沈澱を C11 培地 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, クエン酸ナトリウム 2g, H<sub>2</sub>O 1g, MgSO<sub>4</sub> 7.5g 0.1% 糖 5g, カゼンノ酸 0.2g, L-トリプトファン 50ppm) で、2 倍に希釈されるように懸濁した。さらに 37℃で振とう培養を続け、30 分後に、連結反応を行なった DNA 溶液を加え、37℃で振とうを 1 時間行ない、テトラサイクリン 5ppm を含む TBAB 寒天培地に塗布した。

37℃で 1 夜培養後、テトラサイクリン耐性の形質転換

体が取得された。

この様にして、相同的交叉によりプロモーターP756が染色体上のトリプトファン合成系遺伝子のすぐ上流にインテグレーションされ、目的とするトリプトファン生産株が得られた。この相同的交叉の結果を第2図に模式的に示す。

例3. (参考例) ファージSP02由来のプロモーターとトリプトファン合成系遺伝子を含有するプラスミドの調製及びその宿主への導入 (第3図)

第3図に示す出発プラスミドpSD5B 136は、枯草菌ファージSP02由来のプロモーター (P201) を含有する0.17MDのEcoR I フラグメントを含有し、その下流に制限酵素切断点BamH I, Sal I及びPst Iを有し、さらにその下流にバチルス・ブミルス (*Bacillus pumilus*) 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子の構造遺伝子を含有する5MDの大きなプラスミドである。該プラスミドはpBL708 (Gene, 16, 199 (1981)) (*Bacillus Genetic Stock Center*, オハイオ・ステート・ユニバーシティから商業的に入手することができ、) をEcoR IとBgl IIで消化し、EcoR IとBamH Iで消化したpBR322と混合、T4 DNAリガーゼで結合反応後、大腸菌600に形質転換を行ない、得られたクロラムフェニコール耐性の形質転換体から調製される。

プラスミドpSD5B 136を制限酵素BamH Iで消化し、次に大腸菌DNAポリメラーゼのKlenowフラグメントで処理した。他方、プラスミドpSDT 111を制限酵素EcoR Iで消化し、次に大腸菌DNAポリメラーゼのKlenowフラグメントで処理した。両DNA断片を混合した後、T4 DNAリガーゼにより連結し、この生成物を用いてトリプトファン要求性大腸菌JA 221を形質転換した。得られたトリプトファン非要求性、アンピシリン耐性でかつクロラムフェニコール耐性の形質転換体よりプラスミドを抽出、分析してSP02ファージ由来プロモーターとトリプトファン合成系遺伝子を含むフラグメントが機能的に連結している大きな10MDの組換えプラスミドpSEY1213が得られた。

このプラスミドpSEY1213を用い、実施例1に記載したのと同様にしてバチルス・アミロリクエファシエンズのトリプトファン生産株パチルスSD-30のコンピメントセルを形質転換した。こうして、相同的交叉によりプロモーターP201が染色体上のトリプトファン合成系遺伝子のすぐ上流にインテグレーションされ、目的とするトリプトファン生産株が得られた。この相同的交叉の結果を第3図に模式的に示す。

実施例4. トリプトファン合成系酵素類の発現

細菌染色体上のトリプトファン遺伝子近傍に、プロモーター配列を導入した菌株パチルスSD1034、及びパチルスSD1035の生産する酵素トリプトファンシンターゼおよびアントラニール酸シンターゼの量を同酵素の活性測定により調った。

プロモーターの導入されていない親株パチルスSD30、

並びにプロモーターが導入されている株パチルスSD1034、及びパチルスSD1035をTAB寒天培地 (Difco社) で前培養し、Spizizen最少培地100mlにOD (660nm) が約0.03になるように接種し、37°CでOD (660nm) が約0.5になるまで振とう培養した。5000rpm、15分間冷却遠心を行い、沈澱をバッファーI (0.025M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.075M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3, 0.01M L-グルタミン、10%グリセリン) で洗浄遠心後、2mlのバッファーII (0.025M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.075M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3, 0.01M-L-グルタミン、4mM MgCl<sub>2</sub>, 40%グリセリン) に懸濁した。リゾチーム0.5mg、DNase5  $\mu$ g添加し、37°Cで30分間インキュベーションした。30,000rpmで、30分間遠心し上清を粗酵素液とした。

Method in Enzymology, 5, 794 (1962) に従って行ったトリプトファンシンターゼ活性測定の結果、およびGenetics, 52, 1303 (1965) に従って行ったアントラニール酸シンターゼ活性測定の結果を示す。

| 菌株     | トリプトファンシンターゼ活性 | アントラニール酸シンターゼ活性 |
|--------|----------------|-----------------|
| SD30   | 100            | 100             |
| SD1034 | 250            | 300             |
| SD1035 | 300            | 320             |

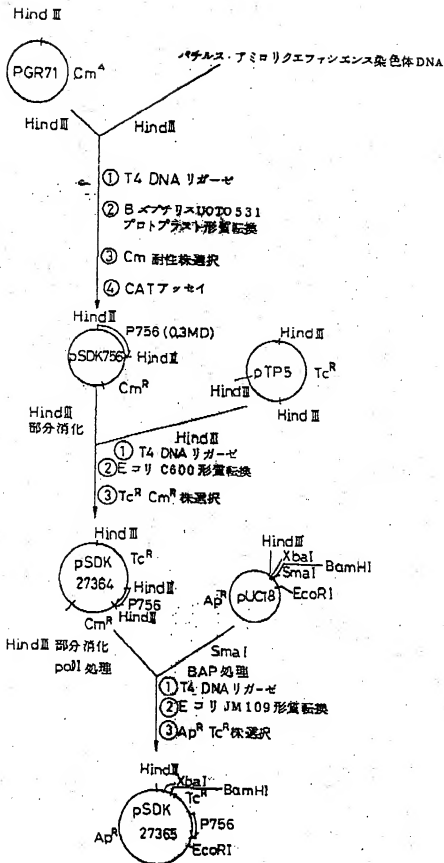
パチルスSD1034においては、P756プロモーター及びアントラニール酸シンターゼ遺伝子を含有するトリプトファン合成系遺伝子のの上流部分が宿主細菌の染色体上のトリプトファン合成系遺伝子の近傍に導入されており、この結果として染色体上に元から存在したトリプトファン合成系の遺伝子の発現が強化されていると共に、追加のアントラニール酸シンターゼ遺伝子が導入されている。このため、トリプトファンシンターゼ活性が約2.5倍に増強され、アントラニール酸シンターゼ活性は約3.0倍に増強された。他方、パチルスSD1035においては、トリプトファン合成系遺伝子の2倍体が形成されており、さらにその片方のトリプトファン合成系遺伝子近傍にP201プロモーター配列DNAが導入されていることにより、アントラニール酸シンターゼ活性、及びトリプトファンシンターゼ活性が3~3.2倍増強された。

実施例5. L-トリプトファンの製造

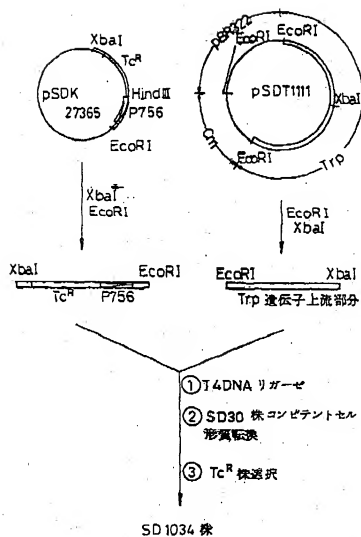
グルコース5%、硫酸0.2%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6%、クエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.02%、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 1ppm、MnSO<sub>4</sub> 1ppmを含む培地 (pH7.0) 2Lにアントラニール酸800ppmを添加し、これにプロモーターの導入されていない菌株パチルスSD30、並びにプロモーターが導入された株パチルスSD1034、及びパチルスSD1035を接種し、35°Cで5Lのジャーファメンターで通気攪はん培養した。培養中、アントラニール酸濃度が50ppm以下まで減少した時点でアントラニール酸濃度が約1000ppmになるように適宜追加添加し、また培養途中グルコースを100g追加し、更にアンモニア水の添加により培地のpHを7.0±0.4に保ちながら15時間培養した。培養液中に



【第1図】



【第2図】



SD 1034 のトリプトファン遺伝子付近の構造

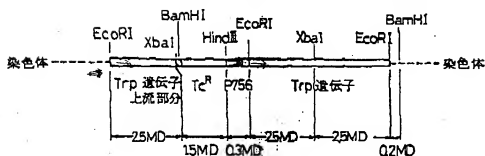
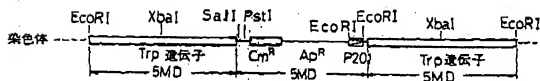


Diagram illustrating the construction of the SD 1035 strain:

- Plasmids:**
  - pSD8136:** Contains *EcoRI*, *PstI*, *BSP*, *Ap<sup>R</sup>*, *pBR322*, and *Cm<sup>R</sup>*.
  - pSDT1111:** Contains *pBR322*, *EcoRI*, *XbaI*, *Trp*, and *Cm<sup>R</sup>*.
- Restriction Enzyme Digestion:**
  - pSD8136 is digested with **BamHI** and **polI**.
  - pSDT1111 is digested with **EcoRI** and **polI**.
- Ligation and Transformation:**
  - ① T4DNA リガーゼ処理 (T4 DNA ligase treatment)
  - ② E コリ JA 221 形質転換 (Transformation into *E. coli* JA 221)
  - ③ トリプトファン非要求性, *Ap<sup>R</sup>*, *Cm<sup>R</sup>* (Selection for tryptophan independence, *Ap<sup>R</sup>*, and *Cm<sup>R</sup>*)
- Resulting Plasmid:**
  - pSEY1213:** Contains *EcoRI*, *PstI*, *Trp* 遺伝子 (Trp gene), *Ap<sup>R</sup>*, and *Cm<sup>R</sup>*.
- Final Steps:**
  - ① SD30 コンピアントセル形質転換 (Transformation of SD30 competent cells)
  - ② *Cm<sup>R</sup>* 株選択 (Selection of *Cm<sup>R</sup>* strains)
- Final Strain:** SD 1035 株

SD 1035 のトリプトファン遺伝子付近の構造



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>

識別記号

厅内整理番号

FI

### 技術表示箇所

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:125)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:07)